(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7226265号
(P7226265)

(45)発行日　令和5年2月21日(2023.2.21)

(24)登録日　令和5年2月13日(2023.2.13)

(51)国際特許分類			FI		
G01N	*27/62*	*(2021.01)*	G01N	27/62	V
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	G01N	27/62	X
H01J	*49/26*	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z
			H01J	49/26	

請求項の数　10　（全19頁）

(21)出願番号　特願2019-210660(P2019-210660)
(22)出願日　令和1年11月21日(2019.11.21)
(65)公開番号　特開2021-81365(P2021-81365A)
(43)公開日　令和3年5月27日(2021.5.27)
審査請求日　令和4年3月7日(2022.3.7)

(73)特許権者　000001993
株式会社島津製作所
京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地
(74)代理人　110001069
弁理士法人京都国際特許事務所
(72)発明者　村瀬 雅樹
京都市中京区西ノ京桑原町１番地 株式会社島津製作所内
(72)発明者　西風 隆司
京都市中京区西ノ京桑原町１番地 株式会社島津製作所内
審査官　伊藤 裕美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　糖ペプチド解析装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

液体クロマトグラフとＭＳ／ＭＳ分析が可能な質量分析装置とを組み合わせた分析装置を用い、糖タンパク質のグリコフォームについての構造解析を行う糖ペプチド解析装置であって、

目的の糖タンパク質由来の糖ペプチドを含む試料を前記分析装置で分析することで得られたデータに基づいて、前記液体クロマトグラフからの溶出時間毎のＭＳ／ＭＳスペクトルを作成するスペクトル作成部と、

前記スペクトル作成部で作成された溶出時間が相違する複数のＭＳ／ＭＳスペクトルから糖ペプチドに由来すると推定される糖ペプチド関連スペクトルを選定し、該糖ペプチド関連スペクトルに基づいて、該糖ペプチドにおけるペプチドの質量を算出するペプチド質量算出部と、

前記糖ペプチド関連スペクトルとそれ以外の全ての又は特定の時間範囲に対応するＭＳ／ＭＳスペクトルとの類似性を判定するスペクトル類似性判定部と、

前記糖ペプチド関連スペクトルとの類似性が高いと判定されたＭＳ／ＭＳスペクトルを、該糖ペプチドのグリコフォーム関連スペクトルとして選別するグリコフォーム関連スペクトル選別部と、

選別された前記グリコフォーム関連スペクトルについての時間軸上での出現頻度の分布を求め、該分布に基づいてグリコフォーム溶出時間範囲を推定するグリコフォーム溶出時間範囲推定部と、

推定された前記グリコフォーム溶出時間範囲内に収集されたＭＳスペクトル上で検出されるイオンピークの中で、前記ペプチド質量算出部で算出されたペプチド質量以上の質量に対応するイオンピークを選出し、該イオンピークに基づいて糖鎖組成を推定する糖鎖組成推定部と、

を備える糖ペプチド解析装置。

【請求項２】

前記ペプチド質量算出部は、各ＭＳ／ＭＳスペクトルに基づくデータベース検索法による糖ペプチドの同定を行い、糖ペプチドの同定が可能であったＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド関連スペクトルとして選定する、請求項１に記載の糖ペプチド解析装置。

【請求項３】

前記ペプチド質量算出部は、オキソニウムイオンが検出されたＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド関連スペクトルとして選定し、該ＭＳ／ＭＳスペクトルにおいて信号強度が最大であるピークが、ペプチドに１個のＮ－アセチルヘキソサミンが結合したＮ結合型糖ペプチドのフラグメントイオンであると仮定してペプチドの質量を算出する、請求項１に記載の糖ペプチド解析装置。

【請求項４】

前記ペプチド質量算出部は、Ｎ結合型糖ペプチドに特徴的であるトリプレットピークが検出されたＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド関連スペクトルとして選定し、該ＭＳ／ＭＳスペクトルにおいてトリプレットピークの中で質量が最も小さいイオンピークを糖鎖のみが脱離したペプチドイオンであると仮定してペプチドの質量を算出する、請求項１に記載の糖ペプチド解析装置。

【請求項５】

前記スペクトル類似性判定部は、糖ペプチド関連スペクトル、及び、それ以外の全ての又は特定の時間範囲に対応するＭＳ／ＭＳスペクトルから、それぞれオキソニウムイオン由来のピークを除去したうえでスペクトルの類似性を判定する、請求項１～４のいずれか１項に記載の糖ペプチド解析装置。

【請求項６】

前記質量分析装置においてＭＳ分析を実行してＭＳスペクトルを取得し、該ＭＳスペクトルにおいて検出されるピークの中で所定の条件を満たすピークの質量電荷比をプリカーサイオンに設定したＭＳ／ＭＳ分析を前記ＭＳ分析に引き続いて実行するように、前記質量分析装置の動作を制御する分析制御部、をさらに備える、請求項１～５のいずれか１項に記載の糖ペプチド解析装置。

【請求項７】

前記スペクトル作成部で作成された複数のＭＳ／ＭＳスペクトルからそれぞれ糖鎖フラグメントピークを検出する糖鎖フラグメント検出部と、

検出された糖鎖フラグメントピークが所定の基準を満たすＭＳ／ＭＳスペクトルを、糖ペプチド候補スペクトルとして選出する糖ペプチド候補スペクトル選出部と、

選出された糖ペプチド候補スペクトルからそれぞれ糖鎖フラグメントピークを削除する糖鎖フラグメント除去部と、

糖鎖フラグメントピーク除去済みの糖ペプチド候補スペクトル同士のピークパターンの類似度を算出するスペクトル類似度算出部と、

前記類似度に基づくクラスタ解析を行い、所定の基準に従って糖ペプチド候補スペクトルを一又は複数のグループに分類するスペクトル分類部と、

をさらに備え、前記スペクトル分類部によりグループ化された糖ペプチド候補スペクトルの全て又は一部を前記ペプチド質量算出部による処理に供する、請求項１～６のいずれか１項に記載の糖ペプチド解析装置。

【請求項８】

液体クロマトグラフとＭＳ／ＭＳ分析が可能な質量分析装置とを組み合わせた分析装置を用い、糖タンパク質の構造解析を行う糖ペプチド解析装置であって、

目的の糖タンパク質由来の糖ペプチドを含む試料を前記分析装置で分析することで得ら

れたデータに基づいて、前記液体クロマトグラフからの溶出時間毎のＭＳ／ＭＳスペクトルを作成するスペクトル作成部と、
　前記スペクトル作成部で作成された複数のＭＳ／ＭＳスペクトルからそれぞれ糖鎖フラグメントピークを検出する糖鎖フラグメント検出部と、
　検出された糖鎖フラグメントピークが所定の基準を満たすＭＳ／ＭＳスペクトルを、糖ペプチド候補スペクトルとして選出する糖ペプチド候補スペクトル選出部と、
　選出された糖ペプチド候補スペクトルからそれぞれ糖鎖フラグメントピークを削除する糖鎖フラグメント除去部と、
　糖鎖フラグメントピーク除去済みの糖ペプチド候補スペクトル同士のピークパターンの類似度を算出するスペクトル類似度算出部と、
　前記類似度に基づくクラスタ解析を行い、所定の基準に従って糖ペプチド候補スペクトルを一又は複数のグループに分類するスペクトル分類部と、
　を備える糖ペプチド解析装置。
【請求項９】
　一又は複数のグループに分類された糖ペプチド候補スペクトルに基づいて、該グループ毎に又は任意の一つのグループについて糖ペプチドにおけるペプチドの質量を算出するペプチド質量算出部、をさらに備える、請求項８に記載の糖ペプチド解析装置。
【請求項１０】
　一つの糖ペプチド候補スペクトルと溶出時間が同じであるＭＳスペクトルと、該糖ペプチド候補スペクトルから求まったペプチドの質量とを利用して、その糖ペプチドの糖鎖組成を推定する糖鎖組成推定部、をさらに備える請求項９に記載の糖ペプチド解析装置。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
　本発明は糖ペプチド解析装置に関し、さらに詳しくは、クロマトグラフ質量分析を利用して糖ペプチド又は糖タンパク質における糖鎖の構造を解析する装置に関する。
【背景技術】
【０００２】
　真核生物では、生体内に存在するタンパク質の多くが糖鎖修飾を受けて、糖タンパク質として発現する。この糖鎖修飾はタンパク質の構造や機能の調節に重要な役割を果たしている。また、近年の研究により、免疫疾患などの各種疾患と糖鎖構造異常や糖化異常との関連性も明らかになってきている。こうしたことから、糖タンパク質や糖ペプチドの構造解析は、生命科学や医療、医薬品開発など様々な分野において非常に重要である。
【０００３】
　糖鎖の構造は非常に多様であり、糖タンパク質には一次構造が同じであって糖鎖構造や糖鎖修飾位置が異なる異性体(グリコフォーム)が多数存在する。糖鎖構造や糖鎖の付き方の差異が糖タンパク質の物理的及び化学的性質に変化をもたらし、糖タンパク質の生理機能に大きな影響を与える。そのため、糖鎖構造や修飾位置の相違の解析は糖タンパク質の機能解析を行う上で重要であり、グリコフォームを網羅的に解析する手法の確立が要望されている。
【０００４】
　従来の一般的な糖タンパク質の糖鎖解析の手順は次の通りである。
　（１）糖タンパク質を精製する。
　（２）酵素消化により糖タンパク質を糖ペプチドへ分解してペプチド混合物を得る。
　（３）ペプチド混合物から糖ペプチドを選択的に抽出し濃縮する。
　（４）逆相カラムを用いた液体クロマトグラフ（ＬＣ）により、糖ペプチドをアミノ酸配列等が異なる糖ペプチド毎に分離する。
　（５）ＬＣにより分離された糖ペプチドをそれぞれ質量分析装置に供し、ＭＳ／ＭＳ分析を実行してＭＳ／ＭＳスペクトルを取得する。
　（６）ＭＳ／ＭＳスペクトルを解析することにより、糖鎖の組成や構造の解析を行う。

【０００５】
上記ＭＳ／ＭＳ分析の際には、まず通常の質量分析（ＭＳ分析）実行し、それにより得られるマススペクトルから例えば信号強度の大きなピーク等の、所定の条件を満たすピークを抽出して自動的にそのピークをターゲットとしたＭＳ／ＭＳ分析を行う、データ依存性解析（ＤＤＡ＝Data Dependent Acquisition）が有用である（特許文献１、非特許文献１等参照）。しかしながら、こうした従来の糖鎖解析方法では次のような問題がある。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【文献】特開２００８－２９８４２７号公報
特開２０１６－１９４５００号公報
国際公開第２０１７／１４５４９６号パンフレット
【非特許文献】
【０００７】
【文献】村瀬（Murase）、ほか６名、「データ-デペンデント・アクイジション・システム・フォー・エヌ-リンクド・グリコペプタイズ・ユージング・MALDI-DIT-TOF MS（Data-dependent acquisition system for N-linked glycopeptides using MALDI-DIT-TOF MS）」、インターナショナル・マス・スペクトロメトリー・コンファレンス（International Mass Spectrometry Conference）、 2012年、ポスターセッション PWe-058
マアース（K. Maass）、ほか４名、「グリコ-ピークファインダ デ・ノボ・コンポジション・アナリシス・オブ・グリココンジュゲイツ（"Glyco-peakfinder" de novo composition analysis of glycoconjugates）」、プロテオミクス（Proteomics）、2007年、Vol.7、No.24、pp.4435-4444
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
逆相カラムを用いて糖ペプチドを分離する場合、ペプチド構造が同じであるグリコフォームは比較的近接した時間に溶出することが多い。そのため、データ依存性解析によりＭＳ／ＭＳ分析を行う場合、質量分析装置のスループットの制約によって、イオン化された一部のグリコフォームについてしかＭＳ／ＭＳスペクトルが取得できない場合が少なくない。そうなると、ＭＳ／ＭＳ分析が行えなかったその残りのグリコフォームの糖鎖構造の解析が行えず、グリコフォームの網羅的な分析に支障をきたす。こうしたことから、たとえ一部のグリコフォームについてのＭＳ／ＭＳ分析ができなかった場合であっても、収集されたデータに基づいて、単一の糖タンパク質に由来するグリコフォームを網羅的に分析することができるような解析手法が必要である。
【０００９】
ＭＳ／ＭＳ分析が行えなかったＭＳスペクトルにおいて検出されたイオンピークが、比較的近接した溶出時間に測定されたＭＳ／ＭＳスペクトルに基づいて推定構造情報（例えば、ペプチド質量）が得られた糖ペプチドと同一のアミノ酸配列を有するグリコフォームに由来するピークである、と仮定して構造推定を行うことは、妥当な構造候補を絞り込む上で有効である。しかしながら、グリコフォームの溶出時間はペプチドのみに依存するわけではなく、糖鎖の化学的特性や構造に依存して変動する。また、特許文献２、３にも記載されているように、糖鎖解析の際に糖鎖に対して様々な化学修飾が導入される場合があるが、その化学修飾の種類に依存してグリコフォームの溶出時間が変動する場合もある。さらに加えて、この溶出時間の変動幅はペプチド毎に異なる。
【００１０】
こうしたことから、単一の糖タンパク質に由来するグリコフォームを同じＬＣ条件で以て分離する場合であっても、ペプチド毎にグリコフォームの溶出時間範囲を予め推定し、その溶出時間範囲内に得られたＭＳ／ＭＳスペクトルに基づいて構造情報が得られたグリ

コフォームに対応した糖鎖解析を行う必要がある。ペプチド毎のグリコフォームの溶出時間範囲の推定は面倒であるうえに、これを高い精度で推定することは難しい。

【００１１】

本発明は上記課題に鑑みて成されたものであり、その主たる目的は、単一の糖タンパク質に由来するペプチド毎のグリコフォームの溶出時間範囲を高い精度で且つ簡便に推定することができ、それによってグリコフォームにおける糖鎖解析の網羅性を高めることができる糖ペプチド解析装置を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

上記課題を解決するために成された本発明の第１の態様の糖ペプチド解析装置は、液体クロマトグラフとＭＳ／ＭＳ分析が可能な質量分析装置とを組み合わせた分析装置を用い、糖タンパク質のグリコフォームについての構造解析を行う糖ペプチド解析装置であって、

目的の糖タンパク質由来の糖ペプチドを含む試料を前記分析装置で分析することで得られたデータに基づいて、前記液体クロマトグラフからの溶出時間毎のＭＳ／ＭＳスペクトルを作成するスペクトル作成部と、

前記スペクトル作成部で作成された溶出時間が相違する複数のＭＳ／ＭＳスペクトルから糖ペプチドに由来すると推定される糖ペプチド関連スペクトルを選定し、該糖ペプチド関連スペクトルに基づいて、該糖ペプチドにおけるペプチドの質量を算出するペプチド質量算出部と、

前記糖ペプチド関連スペクトルとそれ以外の全ての又は特定の時間範囲に対応するＭＳ／ＭＳスペクトルとの類似性を判定するスペクトル類似性判定部と、

前記糖ペプチド関連スペクトルとの類似性が高いと判定されたＭＳ／ＭＳスペクトルを、該糖ペプチドのグリコフォーム関連スペクトルとして選別するグリコフォーム関連スペクトル選別部と、

選別された前記グリコフォーム関連スペクトルについての時間軸上での出現頻度の分布を求め、該分布に基づいてグリコフォーム溶出時間範囲を推定するグリコフォーム溶出時間範囲推定部と、

推定された前記グリコフォーム溶出時間範囲内に収集されたＭＳスペクトル上で検出されるイオンピークの中で、前記ペプチド質量算出部で算出されたペプチド質量以上の質量に対応するイオンピークを選出し、該イオンピークに基づいて糖鎖組成を推定する糖鎖組成推定部と、

を備えるものである。

【００１３】

ここでいう「液体クロマトグラフとＭＳ／ＭＳ分析が可能な質量分析装置とを組み合わせた分析装置」は、液体クロマトグラフのカラム出口から溶出する溶出液の少なくとも一部を質量分析装置のイオン化部に導入する液体クロマトグラフ質量分析装置（ＬＣ－ＭＳ）のほか、液体クロマトグラフのカラム出口からの溶出液を所定の時間毎に分取してサンプルを調製し、そのサンプルをマトリクス支援レーザ脱離イオン源等のイオン源を有する質量分析装置で質量分析する液体クロマトグラフ質量分析システムでもよい。

【００１４】

また、「ＭＳ／ＭＳ分析が可能な質量分析装置」とは、一般的には、イオントラップと飛行時間型質量分析器（ＴＯＦＭＳ）との組み合わせを用いた装置、ＴＯＦ／ＴＯＦ型の質量分析装置、四重極－飛行時間型（Ｑ－ＴＯＦ型）質量分析装置、などが有用である。

【発明の効果】

【００１５】

ペプチド構造が同じである一群のグリコフォームは糖鎖修飾の位置が異なったり糖鎖構造が僅かに異なるだけであるので、一般に、そのグリコフォームから得られるＭＳ／ＭＳスペクトルのパターンの類似性は高い。そこで、本発明の上記態様に係る糖ペプチド構造解析装置において、スペクトル類似性判定部及びグリコフォーム関連スペクトル選別部は、例えば、糖ペプチドに由来すると推定されるＭＳ／ＭＳスペクトル（糖ペプチド関連ス

ペクトル）とそれ以外の全ての又は特定の時間範囲に対応するＭＳ／ＭＳスペクトルとの類似度を所定のアルゴリズムに従って算出し、その類似度を予め定めた閾値と比較することで、一つの糖ペプチドのグリコフォーム由来であると推定されるＭＳ／ＭＳスペクトル（グリコフォーム関連スペクトル）を抽出する。

【００１６】

上述したように、或る糖ペプチドとペプチド構造が共通する多種多様なグリコフォームの溶出時間は全く同一にはならないものの、比較的近接した時間に溶出する傾向にある。そのため、選別された多数のグリコフォーム関連スペクトルについての時間軸上での出現頻度の分布、つまりヒストグラムを作成すると、該ヒストグラムにはピークが出現する。このピークに対応する溶出時間範囲は、目的とする一群の、つまりはペプチド構造が同じであるグリコフォームが溶出する確率が高い溶出時間範囲と考えられる。そこで、グリコフォーム溶出時間範囲推定部は例えば、上記ヒストグラムにおけるピークの概略的な幅に基づいて、グリコフォーム溶出時間範囲を推定する。

【００１７】

このグリコフォーム溶出時間範囲には、質量分析装置のスループットの制約等のために、ＭＳスペクトルは得られたもののＭＳ／ＭＳスペクトルが取得されなかったグリコフォームが溶出している可能性がある。そこで、糖鎖組成推定部は、ＭＳ／ＭＳスペクトルではなく、そのグリコフォーム溶出時間範囲内に収集されたＭＳスペクトル上で検出されるイオンピークを利用して糖鎖組成を推定する。

【００１８】

本発明の上記態様に係る糖ペプチド解析装置によれば、ペプチド毎に異なるグリコフォームの溶出時間範囲を簡便に且つ正確に、スペクトルの類似度という客観的な指標に基づいて推定することができる。それにより、糖ペプチド及びペプチド混合物の試料から収集される膨大な量のデータから、グリコフォームを取りこぼすことなくその糖鎖組成を推定することができる。また逆に、糖ペプチドに関連するグリコフォームが含まれる可能性が低いＭＳスペクトルを糖鎖組成の推定対象から除外することができるので、糖鎖組成の推定に要する時間を短縮し、推定精度を向上させることができる。さらにまた、その糖鎖組成の推定結果を検証するための時間や手間も軽減することができる。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】本発明の一実施形態である糖ペプチド解析装置の要部のブロック構成図。

【図２】本実施形態の糖ペプチド解析装置における解析処理手順を示すフローチャート。

【図３】本実施形態の糖ペプチド解析装置におけるグリコフォーム溶出時間範囲推定の手順の説明図。

【図４】本実施形態の糖ペプチド解析装置におけるグリコフォーム溶出時間範囲推定の実例を示す図。

【図５】本実施形態の糖ペプチド解析装置での解析対象である糖ペプチドを分類する糖ペプチド選別分類部の要部のブロック構成図。

【図６】糖ペプチド選別分類部での糖ペプチド分類処理の手順を示すフローチャート。

【図７】糖ペプチド選別分類部において階層的クラスタ解析による分類結果の一例を示す図。

【発明を実施するための形態】

【００２０】

以下、本発明の一実施形態である糖ペプチド解析装置について、添付図面を参照して説明する。図１は、本実施形態の糖ペプチド解析装置の要部のブロック構成図である。

【００２１】

この糖ペプチド解析装置は、試料に対して所定の分析を実行してデータを収集する分析部１と、収集されたデータを解析処理するデータ解析部２と、入力部３と、表示部４と、を備える。分析部１は、逆相カラムを用いた液体クロマトグラフ部（ＬＣ部）１１と、ＭＳ／ＭＳ分析が可能である質量分析部（ＭＳ／ＭＳ部）１２と、を含む。

【００２２】
データ解析部２は、機能ブロックとして、スペクトルデータ格納部２１と糖鎖解析部２２とを含み、糖鎖解析部２２は、ペプチド質量算出部２３、スペクトル類似度算出部２４、グリコフォーム関連スペクトル選別部２５、グリコフォーム溶出時間算出部２６、糖鎖組成推定部２７、解析結果表示処理部２８などを含む。
【００２３】
分析部１において質量分析部１２は例えば、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）イオン源を搭載したイオントラップ飛行時間型質量分析装置であり、液体クロマトグラフ部１１のカラムから溶出した溶出液の全量又は一部の量をイオン源に直接導入し、繰り返し質量分析を行うものとすることができる。分析部１は、液体クロマトグラフ部１１と質量分析部１２とが直結された構成でなく、液体クロマトグラフ部１１で成分分離された溶出液を分取・分画して複数のサンプルを調製し、その複数のサンプルをそれぞれ質量分析部１２で質量分析する構成でもよい。その場合、質量分析部１２はマトリクス支援レーザ脱離イオン化（ＭＡＬＤＩ）イオン源を用いたＭＡＬＤＩ－ＩＴ－ＴＯＦＭＳ等を用いることができる。
【００２４】
本装置において、データ解析部２の実体は汎用のパーソナルコンピュータ又はより性能の高いワークステーションであり、そうしたコンピュータにインストールされた専用のデータ処理用プログラムを該コンピュータにおいて動作させることで図１に示したような各機能ブロックの機能が実現されるものとすることができる。但し、後述するようなデータベース検索を実施する場合、そのデータベース自体はデータ解析部２に含まれていてもよいし、データ解析部２には含まれないデータベースにアクセスして必要なデータのみを該データベースから抽出する構成としてもよい。
【００２５】
次に、本実施形態の糖ペプチド解析装置を用いた解析動作の一例を、図１に加え、図２、図３を参照しつつ説明する。図２は、本実施形態の糖ペプチド解析装置における解析処理手順を示すフローチャート、図３は、グリコフォーム溶出時間範囲推定の手順の説明図である。
【００２６】
分析部１による分析対象の試料は従来法と同様の手順で用意される。即ち、まず目的とする糖タンパク質を精製したうえで、酵素消化によりその糖タンパク質を糖ペプチドへ分解してペプチド混合物を得る。そして、そのペプチド混合物から糖ペプチドを選択的に抽出し濃縮する。
【００２７】
なお、シアル酸又はそのほかの酸性糖を含む糖鎖修飾を受けた糖ペプチドを分析する場合には、その酸性糖の結合様式に特異的な化学修飾による前処理を実施し、その処理済みの試料をＬＣ／ＭＳ分析に供するようにすることができる。即ち、測定対象のペプチド混合物は化学修飾を受けた糖ペプチドを含んでいてもよい。
【００２８】
分析部１は、上記のように用意された糖ペプチド試料に対しＬＣ／ＭＳ分析を実行する。即ち、液体クロマトグラフ部１１では試料中の各種の糖ペプチドを時間方向に分離し、質量分析部１２は液体クロマトグラフ部１１のカラムから溶出した溶出液に対し所定の質量分析を繰り返し実施する。質量分析部１２はデータ依存性解析によるＭＳ／ＭＳ分析を行う。具体的には、まず所定の質量電荷比範囲に亘る通常のＭＳ分析を実行しマススペクトル（ＭＳスペクトル）を取得し、そのマススペクトルにおいて所定の選択条件に適合する１又は複数のピークを選択して該ピークの質量電荷比をプリカーサイオンとするＭＳ／ＭＳ分析をＭＳ分析に引き続いて実行する。この１回のＭＳ分析と１又は複数回のＭＳ／ＭＳ分析とを１つのサイクルとしてこれを繰り返す。
【００２９】
時間経過とともに、こうしてＭＳ分析及びＭＳ／ＭＳ分析により得られたデータは分析

部１からデータ解析部２へ送られ、スペクトルデータ格納部２１に格納される。したがって、スペクトルデータ格納部２１には、保持時間（溶出時間）毎に、ＭＳスペクトルを構成するデータとそのＭＳスペクトルに関連するＭＳ／ＭＳスペクトルを構成するデータとが格納される。

【００３０】

通常、糖ペプチドの分子関連イオンピークの信号強度は高いから、上記選択条件を適切に設定することで、糖ペプチドの分子関連イオンピークを効率良く選択してＭＳ／ＭＳ分析することができる。但し、ＭＳ分析に引き続いて同じサイクル中に実行可能なＭＳ／ＭＳ分析の回数には時間的な制約があるから、同じペプチド構造を有し糖鎖構造等が相違するグリコフォーム由来のイオンが多数、マススペクトル上で観測されると、一部のグリコフォームについてはＭＳ／ＭＳ分析ができなくなる。そのため、ＭＳスペクトルには或る糖ペプチドの分子関連イオンピークが観測されていたとしても、その糖ペプチドに対応するＭＳ／ＭＳスペクトルは存在しない、ということがしばしばある。

【００３１】

上述したように収集されたデータに基づいて、糖鎖解析部２２は次のような解析処理を実行する。

【００３２】

ペプチド質量算出部２３は、まず、全てのＭＳ／ＭＳスペクトルの中から、糖ペプチド由来のＭＳ／ＭＳスペクトルである可能性が高いもの、つまりは或る程度高い確度で以て糖ペプチド由来であると判断できるＭＳ／ＭＳスペクトルを、糖ペプチド関連スペクトルとして選出する（図３（ａ）参照）。そして、選出したＭＳ／ＭＳスペクトル（糖ペプチド関連スペクトル）毎にそれぞれ、そのＭＳ／ＭＳスペクトルにおいて観測されるメインピークの情報からペプチド質量、つまり糖ペプチドのうちのペプチド部分のみの質量を推算する（ステップＳ１）。糖ペプチド関連スペクトルの選出は例えば次のような方法のいずれかで行うことができる。

【００３３】

＜糖ペプチド関連スペクトルの第１の選出方法＞

ペプチド質量算出部２３は、対象のＭＳ／ＭＳスペクトルから、ノイズピーク等を除去した有意なピークの情報を収集してピークリストを作成する。そして、このピークリストと予め設定された検索条件とに基づくデータベース検索により、糖ペプチドの同定を試みる。そして、糖ペプチドの同定が可能であったＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド関連スペクトルとする。

【００３４】

データベース検索条件には、例えば特定の糖による修飾又は糖の開裂断片による修飾が存在するといった事前情報に基づいて推定された糖鎖（翻訳後修飾）情報などを含むようにするとよい。また、データベース検索には、米国マトリクスサイエンス社が提供しているマスコットMascotに含まれるＭＳ／ＭＳイオンサーチなどの、プロテオーム解析用である既存のタンパク質データベース検索エンジンを用いることができる。糖ペプチドが同定されればペプチドのアミノ酸配列が分かるから、それからペプチド質量を推算することができる。なお、こうした、ＭＳ／ＭＳスペクトルに対してタンパク質データベース検索を用いた糖ペプチド解析を行う際には、事前に糖ペプチド由来のＭＳ／ＭＳスペクトルとそうでないスペクトルとを分類することが好ましいが、それについては後述する。

【００３５】

＜糖ペプチド関連スペクトルの第２の選出方法＞

糖ペプチド由来のイオンに対して衝突誘起解離（ＣＩＤ）を伴うＭＳ／ＭＳ分析を行うと、ペプチド部分よりも糖鎖部分が優先的に開裂し、糖残基が順番に脱離したペプチドに由来するイオン、つまりは糖鎖の断片化により生じた糖鎖フラグメントイオン（オキソニウムイオン）が生じる場合がある。そこでペプチド質量算出部２３は、対象のＭＳ／ＭＳスペクトルにおいてこうしたオキソニウムイオンが検出されるか否か判定し、オキソニウムイオンが検出されたＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド関連スペクトルとする。そして

、対象の糖ペプチドがＮ結合型糖ペプチドであり、且つ、質量分析部１２がＥＳＩイオン源を搭載した質量分析装置である場合には、ＭＳ／ＭＳスペクトルにおいて信号強度が最大であるピークを、ペプチドに１個のＮ－アセチルヘキソサミン（ＨｅｘＮＡｃ）が結合したＮ結合型糖ペプチドフラグメントイオンであると仮定し、そのピークの質量電荷比からペプチド質量を推算する。

なお、オキソニウムイオンピークが信号強度最大となる場合もあるため、信号強度が最大であるピークを見つける際に、事前にピークリスト中からオキソニウムイオンピークを除いてもよい。

【００３６】

＜糖ペプチド関連スペクトルの第３の選出方法＞

対象の糖ペプチドがＮ結合型糖ペプチドであって、ＭＡＬＤＩイオン源を搭載した質量分析装置を使用する場合、ＭＳ／ＭＳスペクトルには特徴的なトリプレットピーク（質量電荷比間隔が低質量電荷比側から８３Da及び１２０Daで並ぶ３本のピーク）が観測されることが知られている。そこでペプチド質量算出部２３は、対象のＭＳ／ＭＳスペクトルにおいて上記のトリプレットピークが検出されるか否かを判定し、トリプレットピークが検出されたＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド関連スペクトルとする。そして、そのトリプレットピークの中で質量電荷比が最小であるピークを糖鎖のみが脱離したペプチドイオンであると仮定して、そのピークの質量電荷比からペプチド質量を推算する。

【００３７】

上記ステップＳ１において糖ペプチド関連スペクトルが選出されたならば、スペクトル類似度算出部２４は、１つの糖ペプチド関連スペクトルとそれ以外のＭＳ／ＭＳスペクトルとについてスペクトルパターンの類似性を示す指標値つまり類似度を、ＭＳ／ＭＳスペクトル毎に計算する（ステップＳ２：図３（ｂ）参照）。

【００３８】

なお、上述した糖鎖フラグメント（オキソニウムイオン）が生成される場合、それらは糖ペプチドに共通に現れるものであるため、それらイオンを含めて類似度を計算すると、同じペプチドに対応するグリコフォームでなくても類似度が見かけ上高くなってしまう。即ち、同じペプチド由来のＭＳ／ＭＳスペクトルであるか否かを判定するうえで、オキソニウムイオンはいわば妨害となる。そこで、類似度を計算する前に、糖ペプチド関連スペクトル及びこれと比較される全てのＭＳ／ＭＳスペクトルから既知であるオキソニウムイオン由来のピークを除去する処理を行うようにしてもよい。また、オキソニウムイオンは経験的にm/z ５００又は５３０以下の低質量電荷比のイオンであり、糖鎖の特異的な組成等を反映したイオンの質量電荷比は概ねそれよりも大きい。そこで、糖ペプチド関連スペクトル及びこれと比較される全てのＭＳ／ＭＳスペクトルから、m/z ５００又は５３０等の事前に指定した質量電荷比値以下の低質量電荷比範囲に存在するピークを全て除去してもよい。

【００３９】

グリコフォーム関連スペクトル選別部２５は、ＭＳ／ＭＳスペクトル毎に求まった類似度の値を所定の閾値と比較し、類似度が閾値以上であるＭＳ／ＭＳスペクトルのみをグリコフォーム関連スペクトルとして選別する（ステップＳ３）。つまりは、糖ペプチド関連スペクトルとの類似性が高いと判定されるＭＳ／ＭＳスペクトルのみをグリコフォーム関連スペクトルとして選別する。ペプチドが同じで糖鎖構造が僅かに異なるグリコフォーム、或いは糖鎖は同じで結合様式や結合位置のみが相違するグリコフォームは、そのＭＳ／ＭＳスペクトルのパターンの類似性が高くなる筈である。したがって、ステップＳ３の選別処理により、同じペプチドの多様なグリコフォームのＭＳ／ＭＳスペクトルを収集することができる（図３（ｃ）参照）。

【００４０】

グリコフォーム溶出時間算出部２６は、ステップＳ３で選別されたＭＳ／ＭＳスペクトルの数つまり出現頻度を、そのＭＳ／ＭＳスペクトルが得られた溶出時間毎に求める。ここでは、液体クロマトグラフ部１１での測定時間全体を所定の時間幅毎に区切り、その区

切られた時間幅毎に上記出現頻度を算出すればよい。そして、その算出結果に基づき、図３（ｄ）に示すような溶出時間に対する出現頻度分布（ヒストグラム）を作成する。このヒストグラムは、ペプチドが同じであるグリコフォームが溶出する可能性の高さを示しているということができる。そこでグリコフォーム溶出時間算出部２６は、ヒストグラムに現れているピークの幅、又はそのピーク波形の分散度合い等に基づいて、一群とみなせるグリコフォームの溶出時間範囲を推定する（ステップＳ４）。

【００４１】

ステップＳ４で溶出時間範囲が決まったならば、糖鎖組成推定部２７はスペクトルデータ格納部２１から、その溶出時間範囲内に得られたＭＳスペクトルを全て読み出す。そして、各ＭＳスペクトルにおいて、ステップＳ１で求まったペプチド質量以上の質量に対応する質量電荷比を示すイオンピークを抽出し、そのイオンピークに基づく糖鎖組成の推定を行う（ステップＳ５）。この糖鎖組成の推定方法は従来一般に行われている方法でよく、例えば、ＭＳスペクトル上のイオンピークが糖ペプチド由来のイオンピークであると仮定し、そのピークに対応する質量からペプチド質量を減じることで糖鎖（糖鎖と仮定されるもの）の質量を求め、その糖鎖質量に一致する糖鎖を総当たり的に探索する方法が考えられる。こうした糖鎖の総当たり的な探索では、非特許文献２に記載の「Glyco-peakfinder」を利用することができる。

【００４２】

溶出時間範囲内のＭＳスペクトルには、上述したような時間的な制約のためにＭＳ／ＭＳ分析が行えなかったグリコフォームに対応するイオンピークが観測されている可能性が高い。したがって、本実施形態の糖ペプチド解析装置では、ＭＳ／ＭＳスペクトルに基づく解析では見落としていたグリコフォームの糖鎖組成や構造も推定することができる。即ち、これまでは解析できなかったグリコフォームも含めたグリコフォームの網羅的な解析が可能である。

解析結果表示処理部２８は、そうして推定された糖鎖組成や構造の解析結果とペプチドの構造解析結果（アミノ酸配列）等とを表示部４に表示する（ステップＳ６）。

【００４３】

一般的に、上記説明におけるステップＳ１では複数の糖ペプチド関連スペクトルが選定されるから、その糖ペプチド関連スペクトル毎に上記ステップＳ２～Ｓ５の処理を実施するとよい。

【００４４】

また、上記ステップＳ４で推定された溶出時間範囲内に得られた全てのＭＳスペクトルをマージしたうえでステップＳ５及びＳ６の処理を実施してもよい。

【００４５】

［実測例］

本実施形態の糖ペプチド解析装置を用いた一実測例として、α１－酸性糖タンパク質のグリコフォームの溶出時間範囲を推定する例を、図４を参照して説明する。

α１－酸性糖タンパク質由来の試料をＬＣ／ＭＳ分析し、それにより収集されたデータに基づいて作成されたＭＳ／ＭＳスペクトルの中から、上述した第２の選出方法（オキソニウムイオンを検出する方法）により糖ペプチド関連スペクトルを選別した。そして、選別された糖ペプチド関連スペクトル及びそのほかのＭＳ／ＭＳスペクトルから、既知のオキソニウムイオン由来のピークを除去し（図４（ａ）参照）、そのうえでスペクトルの類似度を算出した。類似度はdot product法により求めた。

【００４６】

図４（ｂ）は、ＭＳ／ＭＳスペクトル毎に算出された類似度の分布を示した図である。ここでは、類似度に対する閾値を０．８に定め、類似度が０．８以上であるＭＳ／ＭＳスペクトルを着目している糖ペプチドのグリコフォーム関連スペクトルとして選出した。図４（ｂ）で分かるように、選出されたグリコフォーム関連スペクトルの溶出時間は、元の、つまりは類似度が低いＭＳ／ＭＳスペクトルの溶出時間に比べてそのばらつきがかなり小さいことが分かる。

【００４７】
そして、図４（ｃ）に示すように、選出したグリコフォーム関連スペクトルの溶出時間上のヒストグラムを作成したところ、１７～２０．５分の間にほぼ全てのグリコフォーム関連スペクトルが収まった。そこで、この着目している糖ペプチドについてはグリコフォーム溶出時間範囲を１７～２０．５分と決定した。
このようにして、本実施形態の糖ペプチド解析装置では、ＭＳ／ＭＳスペクトルを利用してペプチド毎に適切な、つまりはグリコフォームをほぼ網羅するような溶出時間範囲を決定することができる。
【００４８】
［ＭＳ／ＭＳスペクトルの選別及び分類］
上述したように上記実施形態の糖ペプチド解析装置では、ステップＳ１でペプチド質量を算出する際の一つの方法として、ＭＳ／ＭＳスペクトルに対してタンパク質データベース検索を用いた方法を挙げている。ＭＳ／ＭＳスペクトルに基づく一般的なプロテオーム解析用のタンパク質データベース検索を行う場合、糖ペプチドを同定できる場合もあるものの、通常、高い信頼度で以て糖ペプチドを同定できるのは一部のＭＳ／ＭＳスペクトルに過ぎず、同定漏れが発生することが避けられない。このような未同定のＭＳ／ＭＳスペクトルに基づいて糖ペプチド解析を行うためには、まずペプチド質量を推定する必要があるが、一般によく用いられるペプチド質量推定法はＮ結合型糖ペプチドを対象としている。そのため、事前に糖ペプチド由来のＭＳ／ＭＳスペクトルとそうでないスペクトルとを分類する必要がある。
【００４９】
即ち、未知の糖ペプチド混合物試料を測定することで得られた多数のＭＳ／ＭＳスペクトルについて網羅的に糖ペプチドの構造解析を行うためには、その多数のＭＳ／ＭＳスペクトルの中から糖ペプチド由来のＭＳ／ＭＳスペクトルを選別するとともに、そのＭＳ／ＭＳスペクトルをペプチド構造が相違する糖ペプチド毎に分類することが重要である。これは、必ずしも図２に示したような処理手順で糖鎖構造解析を行う場合に限るものではなく、ＭＳ／ＭＳスペクトルに基づく糖タンパク質、糖ペプチドの解析の際に共通の課題でもある。
【００５０】
図５は、図１に示した上記実施形態の糖ペプチド解析装置におけるデータ解析部２０に追加することができる糖ペプチド選別分類部２００のブロック構成を示す図である。この糖ペプチド選別分類部２００は、機能ブロックとして、糖鎖フラグメントピーク検出部２０１、糖ペプチド候補スペクトル選別部２０２、糖鎖フラグメントピーク除去部２０３、スペクトル類似度算出部２０４、糖ペプチド候補スペクトル分類部２０５、を含む。
【００５１】
図６は糖ペプチド選別分類部２００の処理手順を示すフローチャートである。
糖鎖フラグメントピーク検出部２０１は、処理対象のＭＳ／ＭＳスペクトルについてそれぞれ、既知である糖鎖フラグメントイオン（オキソニウムイオン）由来のピークを検出する（ステップＳ１１）。糖鎖を化学修飾した場合には、被修飾糖鎖フラグメントイオンを検出の対象として加えてもよい。糖鎖フラグメントイオンピークが検出されないＭＳ／ＭＳスペクトルは、糖ペプチド由来のＭＳ／ＭＳスペクトルでない可能性が高いため、ここで排除される。
【００５２】
次に糖ペプチド候補スペクトル選別部２０２は、ステップＳ１１で検出された糖鎖フラグメントイオンピークが所定の基準を満たすか否かを判定し、所定の基準を満たす糖鎖フラグメントイオンピークを含むＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド候補スペクトルとして選別する（ステップＳ１２）。所定の基準としては、検出されたイオンピークの数が所定個数以上であるもの、又は、Ｎ－アセチルヘキソサミン（ＨｅｘＮＡｃ）などの特定の糖鎖フラグメントイオンピークの強度がその一つのＭＳ／ＭＳスペクトル中の全てのイオンピークの中で所定の順位以上であるもの、などとすればよい。ステップＳ１１で糖鎖フラ

グメントイオンピークが検出されたとしても、偶然に糖鎖フラグメントイオンと同じ又は質量がきわめて近い別のイオンが存在している場合もあるが、そうしたケースの少なくとも一部がここで排除される。

【００５３】

次いで、糖鎖フラグメントピーク除去部２０３は、選別された糖ペプチド候補スペクトルそれぞれについて、糖鎖フラグメントイオンピークを除去する（ステップＳ１３）。この際に、単に検出された糖鎖フラグメントイオンピークを除くほか、主要な糖鎖フラグメントイオンが含まれる所定の質量電荷比範囲（例えば m/z ５３０以下の範囲）のピークを全て除去するなどの方法を採ってもよい。

【００５４】

スペクトル類似度算出部２０４は、糖鎖フラグメントイオン由来ピークを除去したあとの糖ペプチド候補スペクトル同士の類似度を、所定のアルゴリズム（例えばドット積法）に従って算出する（ステップＳ１４）。類似度を示すスコアとしては、ペプチドや代謝物のライブラリ検索手法として知られるスコアリング手法のいずれかを用いればよい。

【００５５】

糖ペプチド候補スペクトル分類部２０５は、ステップＳ１４で得られた糖ペプチド候補スペクトル間の類似度を用いて階層的クラスタ解析を行い、その結果に基づき、糖ペプチド候補スペクトルを分類する（ステップＳ１５）。こうして選別及び分類したＭＳ／ＭＳスペクトル（糖ペプチド候補スペクトル）を、例えば糖鎖解析部２２での上述したような解析処理の対象として出力する（ステップＳ１６）。上記階層的クラスタ解析においてスペクトル間の距離の算出法としては例えばユークリッド距離を用いることができる。また、クラスタ間の距離の測定法としてはウォード法を用いることができる。

【００５６】

ステップＳ１４、Ｓ１５では、類似度算出の対象とする糖ペプチド候補スペクトルを所定の溶出時間範囲毎に分割し、溶出時間範囲毎の部分的なスペクトルについて類似度を算出してもよい。例えば、溶出時間全体が６０分である場合に、これを５分毎に区切って全部の１２個の溶出時間範囲を設定し、その範囲内に含まれるスペクトルについて階層的クラスタ解析を実施してもよい。或いは、所定の溶出時間（例えば、３分）以内のスペクトル同士について、類似度を求めてもよい。むろん、溶出時間全体のスペクトル間の類似度を求めたあとに、溶出時間全体を適宜分割し、不要な溶出時間範囲を削除してもよい。また、分割する溶出時間範囲や、類似度の算出対象外とする溶出時間の間隔は、既知である糖ペプチドの溶出時間の分布等に基づいて決めればよい。

【００５７】

図７は、α－１酸性糖タンパク質の混合物試料に対してＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析を行って得られたＭＳ／ＭＳスペクトルについて上記処理を実施した場合のクラスタ解析結果の一例を示す図である。図７の縦軸、横軸には、溶出時間で表したＭＳ／ＭＳスペクトルを同じ順に並べており、縦横の交点に2スペクトル間の類似度の大きさをグレイスケールで示している。したがって、図７で右下がり４５°の斜めの線は同じスペクトル同士の類似度を示している。また、この線を挟んで上下は対称である。

【００５８】

図７を見れば分かるように、ＭＳ／ＭＳスペクトルは複数個の異なる糖ペプチドのクラスタに分類されている。このうち、ＧＰ１、ＧＰ２で示した二つのクラスタは、データベース検索によって高い信頼度で以て同定された糖ペプチド候補スペクトルであった。一方、「unknown」と記したクラスタは、未同定である糖ペプチド候補スペクトルであった。このように、多数のＭＳ／ＭＳスペクトルを予め選別且つ分類したうえで上述したように糖鎖解析部２２で解析処理を行うことで、データベース検索による糖ペプチドの同定効率を向上させることができるとともに、疑陽性のおそれのある解析結果を減らすことができる。また、もともと糖ペプチドを同定する必要のないＭＳ／ＭＳスペクトルを排除しているので、無駄な処理を行う必要がなくなる。

【００５９】

なお、上記実施形態及び上述した変形例は本発明の一例にすぎず、本発明の趣旨の範囲で適宜変形、修正、追加等を行っても本願特許請求の範囲に包含されることは当然である。

【００６０】

［種々の態様］

上述した例示的な実施形態は、以下の態様の具体例であることが当業者により理解される。

【００６１】

（第１項）本発明の一態様の糖ペプチド解析装置は、液体クロマトグラフとＭＳ／ＭＳ分析が可能な質量分析装置とを組み合わせた分析装置を用い、糖タンパク質のグリコフォームについての構造解析を行う糖ペプチド解析装置であって、

目的の糖タンパク質由来の糖ペプチドを含む試料を前記分析装置で分析することで得られたデータに基づいて、前記液体クロマトグラフからの溶出時間毎のＭＳ／ＭＳスペクトルを作成するスペクトル作成部と、

前記スペクトル作成部で作成された溶出時間が相違する複数のＭＳ／ＭＳスペクトルから糖ペプチドに由来すると推定される糖ペプチド関連スペクトルを選定し、該糖ペプチド関連スペクトルに基づいて、該糖ペプチドにおけるペプチドの質量を算出するペプチド質量算出部と、

前記糖ペプチド関連スペクトルとそれ以外の全ての又は特定の時間範囲に対応するＭＳ／ＭＳスペクトルとの類似性を判定するスペクトル類似性判定部と、

前記糖ペプチド関連スペクトルとの類似性が高いと判定されたＭＳ／ＭＳスペクトルを、該糖ペプチドのグリコフォーム関連スペクトルとして選別するグリコフォーム関連スペクトル選別部と、

選別された前記グリコフォーム関連スペクトルについての時間軸上での出現頻度の分布を求め、該分布に基づいてグリコフォーム溶出時間範囲を推定するグリコフォーム溶出時間範囲推定部と、

推定された前記グリコフォーム溶出時間範囲内に収集されたＭＳスペクトル上で検出されるイオンピークの中で、前記ペプチド質量算出部で算出されたペプチド質量以上の質量に対応するイオンピークを選出し、該イオンピークに基づいて糖鎖組成を推定する糖鎖組成推定部と、

を備えるものである。

【００６２】

第１項に記載の糖ペプチド解析装置によれば、ペプチド毎に異なるグリコフォームの溶出時間範囲を簡便に且つ正確に、スペクトルの類似度という客観的な指標に基づいて推定することができる。それによって、糖ペプチド及びペプチド混合物の試料から収集される膨大な量のデータから、グリコフォームを取りこぼすことなくその糖鎖組成を推定することができる。また逆に、糖ペプチドに関連するグリコフォームが含まれる可能性が低いＭＳスペクトルを糖鎖組成の推定対象から除外することができるので、糖鎖組成の推定に要する時間を短縮し、推定精度を向上させることができる。さらにまた、その糖鎖組成の推定結果を検証するための時間や手間も軽減することができる。

【００６３】

（第２項）第１項に記載の糖ペプチド解析装置において、前記ペプチド質量算出部は、各ＭＳ／ＭＳスペクトルに基づくデータベース検索法による糖ペプチドの同定を行い、糖ペプチドの同定が可能であったＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド関連スペクトルとして選定するものとすることができる。

【００６４】

第２項に記載の糖ペプチド解析装置によれば、Ｎ結合型糖鎖を含むペプチド、Ｏ結合型糖鎖を含むペプチドのいずれについても、糖ペプチド関連スペクトルを選定することができる。

【００６５】

（第３項）第１項に記載の糖ペプチド解析装置において、前記ペプチド質量算出部は、

オキソニウムイオンが検出されたＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド関連スペクトルとして選定し、該ＭＳ／ＭＳスペクトルにおいて信号強度が最大であるピークが、ペプチドに１個のＮ－アセチルヘキソサミンが結合したＮ結合型糖ペプチドのフラグメントイオンであると仮定してペプチドの質量を算出するものとすることができる。

【００６６】

第３項に記載の糖ペプチド解析装置によれば、特に、対象の糖ペプチドがＮ結合型糖ペプチドであり、且つ、イオン源としてＥＳＩイオン源を搭載した質量分析装置を用いた分析装置でＬＣ／ＭＳ分析を実行する場合に、糖ペプチド関連スペクトルを良好に選定して、そのペプチド質量を算出することができる。

【００６７】

（第４項）第１項に記載の糖ペプチド解析装置において、前記ペプチド質量算出部は、Ｎ結合型糖ペプチドに特徴的であるトリプレットピークが検出されたＭＳ／ＭＳスペクトルを糖ペプチド関連スペクトルとして選定し、該ＭＳ／ＭＳスペクトルにおいてトリプレットピークの中で質量が最も小さいイオンピークを糖鎖のみが脱離したペプチドイオンであると仮定してペプチドの質量を算出するものとすることができる。

【００６８】

第４項に記載の糖ペプチド解析装置によれば、特に、イオン源としてＭＡＬＤＩイオン源を搭載した質量分析装置を用いた分析装置でＬＣ／ＭＳ分析を実行する場合に、糖ペプチド関連スペクトルを良好に選定して、そのペプチド質量を算出することができる。

【００６９】

（第５項）第１項～第４項のいずれか１項に記載の糖ペプチド解析装置において、前記スペクトル類似性判定部は、糖ペプチド関連スペクトル、及び、それ以外の全ての又は特定の時間範囲に対応するＭＳ／ＭＳスペクトルから、それぞれオキソニウムイオン由来のピークを除去したうえでスペクトルの類似性を判定するものとすることができる。

【００７０】

第５項に記載の糖ペプチド解析装置によれば、ＭＳ／ＭＳスペクトルの類似度の算出の精度を向上させることができ、それによってグリコフォームの溶出時間範囲の的確性も向上させることができる。その結果、グリコフォームの取りこぼしをより少なくすることができる。

【００７１】

（第６項）第１項～第５項のいずれか１項に記載の糖ペプチド解析装置では、前記質量分析装置においてＭＳ分析を実行してＭＳスペクトルを取得し、該ＭＳスペクトルにおいて検出されるピークの中で所定の条件を満たすピークの質量電荷比をプリカーサイオンに設定したＭＳ／ＭＳ分析を前記ＭＳ分析に引き続いて実行するように、前記質量分析装置の動作を制御する分析制御部、をさらに備えるものとすることができる。

【００７２】

第６項に記載の糖ペプチド解析装置によれば、液体クロマトグラフからの溶出液中に糖ペプチド等の成分が含まれている場合に、該成分についてのＭＳ／ＭＳスペクトルを自動的に取得することができる。また、プリカーサイオンを選択するための所定の条件を適切に設定することにより、溶出液中に含まれる、夾雑物等の不要な成分に対するＭＳ／ＭＳ分析の実行を回避することができ、その分だけ、有意な成分に対するＭＳ／ＭＳ分析の実行の機会を増やすことができる。

【００７３】

（第７項）第１項～第６項のいずれか１項に記載の糖ペプチド解析装置では、

前記スペクトル作成部で作成された複数のＭＳ／ＭＳスペクトルからそれぞれ糖鎖フラグメントピークを検出する糖鎖フラグメント検出部と、

検出された糖鎖フラグメントピークが所定の基準を満たすＭＳ／ＭＳスペクトルを、糖ペプチド候補スペクトルとして選出する糖ペプチド候補スペクトル選出部と、

選出された糖ペプチド候補スペクトルからそれぞれ糖鎖フラグメントピークを削除する糖鎖フラグメント除去部と、

糖鎖フラグメントピーク除去済みの糖ペプチド候補スペクトル同士のピークパターンの類似度を算出するスペクトル類似度算出部と、
前記類似度に基づくクラスタ解析を行い、所定の基準に従って糖ペプチド候補スペクトルを一又は複数のグループに分類するスペクトル分類部と、
をさらに備え、前記スペクトル分類部によりグループ化された糖ペプチド候補スペクトルの全て又は一部を前記ペプチド質量算出部による処理に供するものとすることができる。

【００７４】

第７項に記載の糖ペプチド解析装置によれば、未知である糖ペプチド混合物試料を測定することで得られた多数のＭＳ／ＭＳスペクトルの中から糖ペプチド由来である可能性が高いものを選別し、さらにペプチド構造が同じ又は類似しているペプチド毎に分類したうえで解析処理を行うことができる。それにより、多数のＭＳ／ＭＳスペクトルに基づいて取りこぼし無く糖ペプチド構造解析を行うことができる。擬陽性を減らして高い精度の糖ペプチド解析を行うことができる。

【００７５】

また、上記第７項に記載の糖ペプチド解析装置は第１～第６項に記載の糖ペプチド解析装置に限定されず、別の手法による糖ペプチド解析を行う際のＭＳ／ＭＳスペクトルの前処理の手法としても有効である。即ち、未知である糖ペプチド混合物試料を測定することで得られたＭＳ／ＭＳスペクトルに基づいて網羅的な糖ペプチド構造解析を行う際に、できるだけ取りこぼし無く糖ペプチド解析を行うとともに、擬陽性を減らしてその推定精度を向上させることを目的として、第８項に記載の糖ペプチド解析装置を用いることができる。

【００７６】

（第８項）上記目的を達成するために成された本発明の第２の態様の糖ペプチド解析装置は、液体クロマトグラフとＭＳ／ＭＳ分析が可能な質量分析装置とを組み合わせた分析装置を用い、糖タンパク質の構造解析を行う糖ペプチド解析装置であって、
目的の糖タンパク質由来の糖ペプチドを含む試料を前記分析装置で分析することで得られたデータに基づいて、前記液体クロマトグラフからの溶出時間毎のＭＳ／ＭＳスペクトルを作成するスペクトル作成部と、
前記スペクトル作成部で作成された複数のＭＳ／ＭＳスペクトルからそれぞれ糖鎖フラグメントピークを検出する糖鎖フラグメント検出部と、
検出された糖鎖フラグメントピークが所定の基準を満たすＭＳ／ＭＳスペクトルを、糖ペプチド候補スペクトルとして選出する糖ペプチド候補スペクトル選出部と、
選出された糖ペプチド候補スペクトルからそれぞれ糖鎖フラグメントピークを削除する糖鎖フラグメント除去部と、
糖鎖フラグメントピーク除去済みの糖ペプチド候補スペクトル同士のピークパターンの類似度を算出するスペクトル類似度算出部と、
前記類似度に基づくクラスタ解析を行い、所定の基準に従って糖ペプチド候補スペクトルを一又は複数のグループに分類するスペクトル分類部と、
を備えるものである。

【００７７】

上記第８項に記載の糖ペプチド解析装置によれば、未知である糖ペプチド混合物試料を測定することで得られたＭＳ／ＭＳスペクトルに基づいて網羅的な糖ペプチド構造解析を行う際に、できるだけ取りこぼし無く糖ペプチド解析を行うことができる。また、擬陽性を減らしてその解析の推定精度を向上させることができる。

【００７８】

（第９項）第８項に記載の糖ペプチド解析装置では、一又は複数のグループに分類された糖ペプチド候補スペクトルに基づいて、該グループ毎に又は任意の一つのグループについて糖ペプチドにおけるペプチドの質量を算出するペプチド質量算出部、をさらに備えるものとすることができる。

【００７９】

（第１０項）また第９項に記載の糖ペプチド解析装置では、一つの糖ペプチド候補スペクトルと溶出時間が同じであるＭＳスペクトルと、該糖ペプチド候補スペクトルから求まったペプチドの質量とを利用して、その糖ペプチドの糖鎖組成を推定する糖鎖組成推定部、をさらに備えるものとすることができる。

【００８０】

上記第９項及び第１０項に記載の糖ペプチド解析装置によれば、糖ペプチド混合物試料をＬＣ／ＭＳ分析して得られた膨大な量のデータに基づいて、糖ペプチドの糖鎖組成を網羅的に且つ精度良く求めることができる。

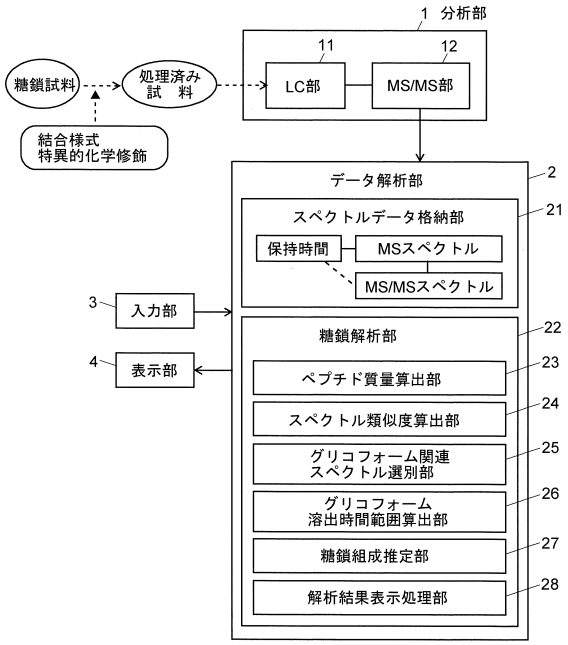
【符号の説明】

【００８１】

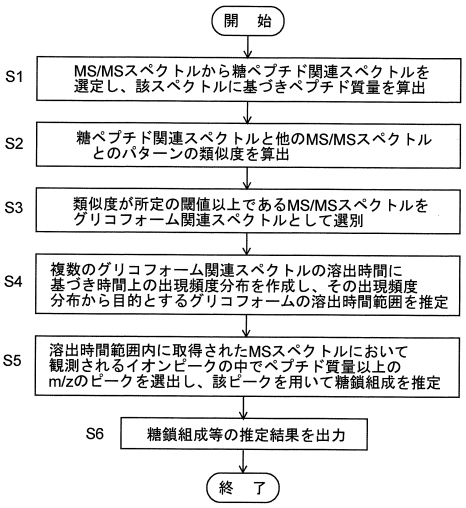
１…分析部
　１１…液体クロマトグラフ部
　１２…質量分析部
２…データ解析部
　２１…スペクトルデータ格納部
　２２…糖鎖解析部
　２３…ペプチド質量算出部
　２４…スペクトル類似度算出部
　２５…グリコフォーム関連スペクトル選別部
　２６…グリコフォーム溶出時間範囲算出部
　２７…糖鎖組成推定部
　２８…解析結果表示処理部
３…入力部
４…表示部
２００…糖ペプチド選別分類部
２０１…糖鎖フラグメントピーク検出部
２０２…糖ペプチド候補スペクトル選別部
２０３…糖鎖フラグメントピーク除去部
２０４…スペクトル類似度算出部
２０５…糖ペプチド候補スペクトル分類部

【図面】

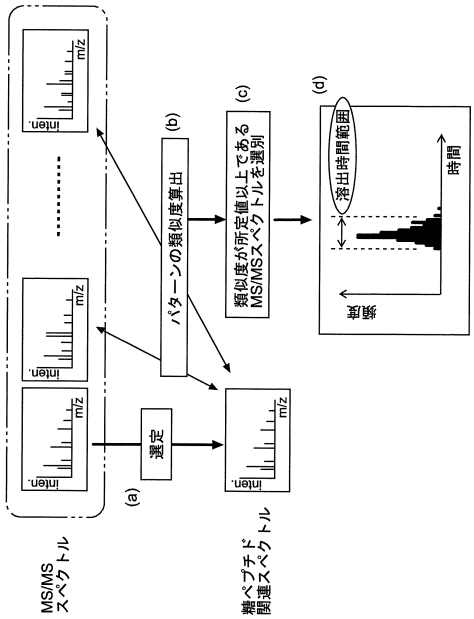
【図１】


1 分析部
11
12
糖鎖試料
処理済み試料
LC部
MS/MS部
結合様式
特異的化学修飾
データ解析部
2
スペクトルデータ格納部
21
保持時間
MSスペクトル
MS/MSスペクトル
3
入力部
4
表示部
糖鎖解析部
22
ペプチド質量算出部
23
スペクトル類似度算出部
24
グリコフォーム関連
スペクトル選別部
25
グリコフォーム
溶出時間範囲算出部
26
糖鎖組成推定部
27
解析結果表示処理部
28

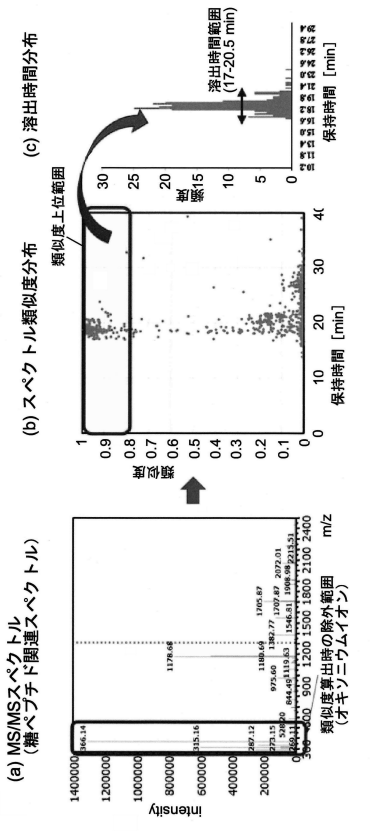
【図２】


開 始
S1
MS/MSスペクトルから糖ペプチド関連スペクトルを
選定し、該スペクトルに基づきペプチド質量を算出
S2
糖ペプチド関連スペクトルと他のMS/MSスペクトル
とのパターンの類似度を算出
S3
類似度が所定の閾値以上であるMS/MSスペクトルを
グリコフォーム関連スペクトルとして選別
S4
複数のグリコフォーム関連スペクトルの溶出時間に
基づき時間上の出現頻度分布を作成し、その出現頻度
分布から目的とするグリコフォームの溶出時間範囲を推定
S5
溶出時間範囲内に取得されたMSスペクトルにおいて
観測されるイオンピークの中でペプチド質量以上の
m/zのピークを選出し、該ピークを用いて糖鎖組成を推定
S6
糖鎖組成等の推定結果を出力
終 了

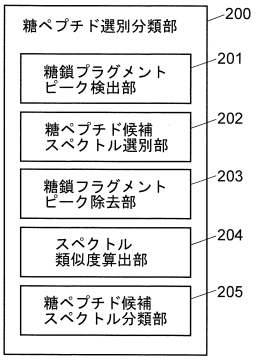
【図３】


Inten.
m/z
(a)
選定
(b)
パターンの類似度算出
(c)
類似度が所定値以上である
MS/MSスペクトルを選別
(d)
溶出時間範囲
時間
頻度
MS/MS
スペクトル
糖ペプチド
関連スペクトル

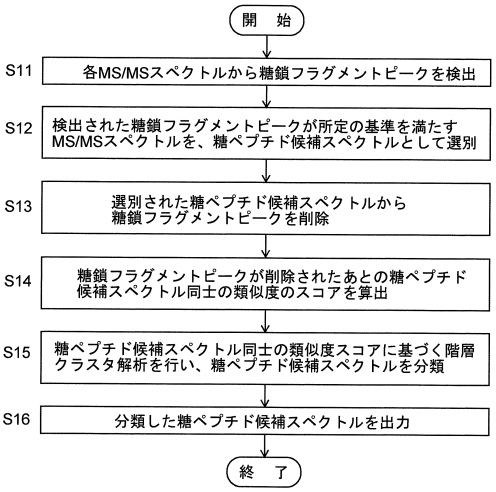
【図４】


(c) 溶出時間分布
溶出時間範囲
(17-20.5 min)
保持時間 [min]
類似度上位範囲
(b) スペクトル類似度分布
類似度
保持時間 [min]
(a) MS/MSスペクトル
(糖ペプチド関連スペクトル)
intensity
m/z
類似度算出時の除外範囲
(オキソニウムイオン)

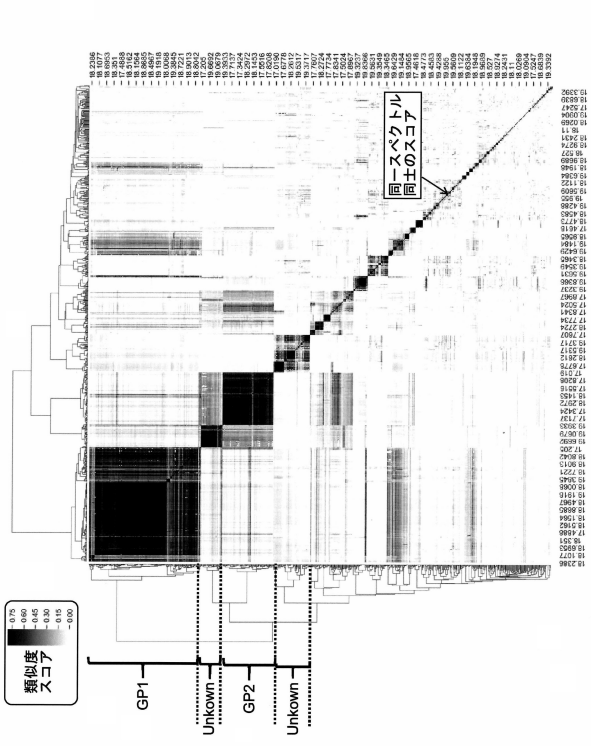
【図５】


糖ペプチド選別分類部
200
糖鎖フラグメント
ピーク検出部
201
糖ペプチド候補
スペクトル選別部
202
糖鎖フラグメント
ピーク除去部
203
スペクトル
類似度算出部
204
糖ペプチド候補
スペクトル分類部
205

【図６】


開　始
S11
各MS/MSスペクトルから糖鎖フラグメントピークを検出
S12
検出された糖鎖フラグメントピークが所定の基準を満たす
MS/MSスペクトルを、糖ペプチド候補スペクトルとして選別
S13
選別された糖ペプチド候補スペクトルから
糖鎖フラグメントピークを削除
S14
糖鎖フラグメントピークが削除されたあとの糖ペプチド
候補スペクトル同士の類似度のスコアを算出
S15
糖ペプチド候補スペクトル同士の類似度スコアに基づく階層
クラスタ解析を行い、糖ペプチド候補スペクトルを分類
S16
分類した糖ペプチド候補スペクトルを出力
終　了

【図７】


同一スペクトル
同士のスコア
類似度
スコア
GP1
Unkown
GP2
Unkown

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第２０１８／０３４３４６（WO，Ａ１）
特開２００５－２４１２５１（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５１８４４８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ ２７／６０ － Ｇ０１Ｎ ２７／７０
Ｇ０１Ｎ ３３／４８ － Ｇ０１Ｎ ３３／５０
Ｈ０１Ｊ ４９／００ － Ｈ０１Ｊ ４９／４８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）